

КУЛЬТИВИРОВАНИЕ BLASTOCYSTIS (RHIZOPODA: LOBOSEA) ИЗ КУР И УТОК

Л.М. Белова

Разработан метод культивирования *Blastocystis galli* из кур и *Blastocystis* sp. из уток. Бластроцисты растут на питательных средах при pH 7.0—7.2 в широком диапазоне температур от 30 до 45°. Оптимальные температуры для культивирования 41—42°. Рост культуры получен на яичных двухфазных средах. Твердая фаза среды представляет собой коагулированное в скошенном положении содержимое куриного яйца. Жидкая фаза может состоять из раствора Хенкса с добавлением 30% либо свежеполученной, либо лиофилизированной куриной сыворотки, либо лошадиной сыворотки. Раствор Хенкса может быть заменен средой 199 (отмечен рост культуры на среде 199 без добавления сыворотки крови). Во все варианты среды добавляются антибиотики из расчета на 1 мл среды: ампициллина — 4 тыс. ЕД, стрептомицина — 1 тыс. ЕД. Через 2—3 пассажа антибиотики можно исключить из среды. Оптимальной средой для культивирования оказалась двухфазная среда с добавлением 30% свежей куриной сыворотки. Пассажи хорошо идут при пересеве 15—20% культуры через 72—96 ч. Размеры культуральных стадий *Blastocystis* sp. варьируют в пределах 2.5—56.2×2.5—56.2 мкм, *B. galli* — 2.5—110×2.5—110 мкм, число ядер в одной особи колеблется от 1 до 64, реже более 100.

Бластроцисты в ранге отряда *Blastocystida* в настоящее время помещаются в тип *Rhizopoda*, класс *Lobosea*, подкласс *Gymnophaeoidea*. Бластроцисты найдены у широкого круга хозяев, начиная от беспозвоночных (Chatton, 1917) и кончая позвоночными, включая человека (Alexeieff, 1991; Brumpt, 1912).

Метод культивирования на питательных средах достаточно хорошо разработан лишь для вида *Blastocystis hominis*, обитающего в толстом кишечнике человека. Культивирование *B. galli*, описанного недавно (Белова, Костенко, 1990) и *Blastocystis* sp. из уток, обнаруженного нами впервые, ранее не проводилось.

Материал и методика. Штамм *B. galli* выделен из слепых отростков толстого кишечника кур на птицефабрике «Ломоносовская» Ленинградской обл. Штамм *Blastocystis* sp. получен из слепых отростков толстого кишечника уток в птицеводстве «Гвардейец» Новгородского р-на.

За основу для культивирования взята двухфазная яичная среда (Zierdt, 1988). На коагулированное в скошенном положении содержимое куриного яйца насыпался либо раствор Хенкса, либо среда 199, к этим жидким компонентам добавлялось 30% либо куриной, либо лошадиной сыворотки. В среду при первых 2—3 пассажах добавляли антибиотики из расчета на 1 мл среды: ампициллина — 4 тыс. ЕД, стрептомицина — 1 тыс. ЕД. Оптимальная температура культивирования 41—42° pH 7.0—7.2.

Биометрические исследования стадий развития бластроцист сделаны с помощью микроскопа МБИ-3, ок.×7, об.×90, цена деления окуляр-микрометра 1.25 мкм. Окрашивание препаратов проводилось по

Таблица 1

Культивирование *Blastocystis galli* на двухфазной яичной среде в растворе Хенкса с добавлением свежей куриной сыворотки

Cultivation of *Blastocystis galli* on biphasic egg medium in Henk's solution with the addition of fresh hen serum

Температура культивирования, °	Рост культуры									
	сутки после посева:									
	1-е	2-е	3-и	4-е	5-е	6-е	7-е	8-е	9-е	10-е
30	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-
35	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
37	-	+	+	+	++	+++	++	++	+	+
39	-	+	+	++	++	+++	++	+	+	+
41	+	++	++++	++++	++++	+++	++	+	+	+
42	++	+++	++++	++++	++++	++++	+++	++	++	+
45	-	-	+	+	++	++	+	+	-	-
48	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Примечание. Здесь и в табл. 2,3: - роста нет; + 1—10 экз.; ++ 10—50; +++ 50—100; ++++ более 100 экз. в 100 п.з. микроскопа МБИ-3, × ок.×7, об.×90.

Таблица 2
Культивирование *Blastocystis galli* на различных вариантах питательных сред
Cultivation of *Blastocystis galli* on different variants of nutrient media

Тем- пе- ра- тура, в °	Питательная среда	Рост культуры							
		сутки после посева:							
		1-е	2-е	3-и	4-е	5-е	6-е	7-е	8-е
30	Раствор Хенкса+30% лошадиной сыворотки	-	-	-	-	+	+	-	-
41—42	Раствор Хенкса+30% лиофилизированной куриной сыворотки	+	+++	++++	++++	++++	+++	++	
	Раствор Хенкса+30% лошадиной сыворотки	+	+++	+++	++++	++++	+++	+++	
	Среда 199+30% лиофилизированной куриной сыворотки	++	+++	++++	++++	++++	++++	+++	
	Среда 199+30% лошадиной сыворотки	+	+++	+++	++++	++++	++++	+++	
45	Раствор Хенкса+30% лошадиной сыворотки	-	-	+	+	++	+	-	

Примечание. Через 72—96 ч в пробирку с интенсивно растущей культурой добавляли 0.5 мл 1%-ного раствора Na_2CO_3 для выравнивания рН.

методу Романовского—Гимза. Микрофотографии выполнены на микроскопе Jenaval Carl Zeiss, съемки нативной культуры проводились с фазовым контрастом.

Результаты исследования. Культивирование *Blastocystis galli* (рис. 1,2; см. вкл.).

Прежде всего нужно было выяснить оптимальный температурный режим культивирования. С этой целью был поставлен ряд экспериментов по культивированию *B. galli* на двухфазной питательной среде с добавлением 30%-ной свежеполученной сыворотки куриной крови при различных температурах. Установлено, что *B. galli* на этой среде может размножаться в очень широком температурном диапазоне 30—45° (табл.1).

Однако в крайних температурных условиях число особей в культуре обычно небольшое, а первые особи микроскопически обнаруживаются только через 72 ч после посева (табл. 1).

Оптимальной температурой для роста культуры *B. galli* оказалась 41—42°. В этих температурных условиях первые особи *B. galli* микроскопически обнаруживались уже через 24 ч после посева культуры. Число клеток быстро нарастает и достигает через 72—96 ч максимума (около $5 \cdot 10^8$ клеток в 1 мл). Особи *B. galli* обычно скапливаются на дне пробирки в виде беловато-желтоватого осадка толщиной 4—6 мм. На 5—6-е сутки число особей *B. galli* в культуре начинает уменьшаться. Этот процесс, по-видимому, связан со сдвигом рН в кислую сторону, добавление к среде 0.5—1 мл 1%-ного раствора Na_2CO_3 выравнивало рН до 7.0—7.2, и рост культуры возобновлялся.

Культивирование *B. galli* на различных вариантах двухфазной яичной среды показало, что эти организмы могут расти на средах с добавлением 30%-ной лошадиной сыворотки или лиофильной куриной сыворотки. Получен неплохой рост культуры без добавления сыворотки крови на среде 199 (табл. 2).

Пассирование *B. galli* на двухфазной яичной среде с добавлением 30%-ной куриной сыворотки было успешным лишь при пересеве 15—20% культуры через каждые 72—96 ч. Клонирование, так же как и пересев 1—2% культуры, было безуспешным. К настоящему времени проведено 25 пассажей культуры *B. galli*.

КУЛЬТИВИРОВАНИЕ BLASTOCYSTIS SP. ИЗ УТОК (РИС. 3; СМ. ВКЛ.)

Температура 41—42° для культивирования *Blastocystis* sp. из уток оказалась, так же, как и для *B. galli* из кур, оптимальной (табл. 3). Культивирование бластоцист из уток проводили на двух вариантах пита-

Таблица 3
Культивирование бластроцист из уток на различных вариантах питательных сред
Cultivation of *Blastocystis* sp. from ducks on different variants of nutrient media

Темпера- тура культиви- рования, в °	Питательная среда	Рост культуры									
		сутки после посева:									
		1-е	2-е	3-и	4-е	5-е	6-е	7-е	8-е	9-е	10-е
30	Раствор Хенкса+30% куриной сыворотки	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-
	Раствор Хенкса+30% лошадиной сыворотки	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-
41—42	Раствор Хенкса+30% куриной сыворотки	+	++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	+
	Раствор Хенкса+30% лошадиной сыворотки	+	++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	+
45	Раствор Хенкса+30% лошадиной сыворотки	-	-	+	+	+	++	+	+	-	-
	Раствор Хенкса+30% куриной сыворотки	-	-	+	+	+	++	+	+	-	-

тельных сред с добавлением 30%-ной лошадиной или 30%-ной куриной сыворотки. Культура на среде с добавлением куриной сыворотки размножалась несколько лучше, чем культура на среде с лошадиной сывороткой.

МОРФОЛОГИЯ КУЛЬТУРАЛЬНЫХ СТАДИЙ BLASTOCYSTIS GALLI ИЗ КУР И *BLASTOCYSTIS* SP. ИЗ УТОК

В культуре у *Blastocystis* sp. и *B. galli* развивается ряд стадий, четко различающихся в световом микроскопе.

Одноядерные стадии представлены двумя типами клеток (табл. 4). Первый тип — мелкие (2.5×2.5 мкм), одноядерные, голые амебки. Обычно эти стадии формируют 3—5 лобоподий, реже имеют сферическую форму без лобоподий. Второй тип — одноядерные амебки, заключенные в прозрачную, довольно крупную сферу, превышающую по своим размерам амебку в 3—4 раза. Чаще амебки располагаются на одном из полюсов сферы. Следует заметить, что только одна стадия развития — голые амебки — не имеют сферы, все остальные стадии бластроцист заключены в сферу.

Двухядерные особи представляют собой две одноядерные амебки, расположенные, как правило, на полюсах сферы (рис. 1—3). Размеры двухядерных стадий у *Blastocystis* sp. варьируют в пределах 12.5—

Таблица 4

Размеры стадий *Blastocystis* sp. из уток и *B. galli* из кур, развивающиеся в культуре (в мкм)
Sizes of stages of *Blastocystis* sp. from ducks and *B. galli* from hens developing in culture (mkm)

Стадии развития паразита	<i>Blastocystis</i> sp.	<i>B. galli</i>
1-ядерные без сферы	2.5×2.5	2.5×2.5
1-ядерные в сфере	$7.5-10 \times 7.5-10$	$6.2-26.2 \times 6.2-26.2$
2-ядерные	$12.5-20 \times 12.5-20$	$8.7-26.2 \times 8.7-26.2$
4-32- ядерные	$20.5-35 \times 20.5-30$	$30.0-75 \times 30.0-75$
33-ядерные и более	$35.5-56.2 \times 35.5-56.2$	$75.5-110 \times 75.5-110$
Предельные вариации размеров для всех стадий	$2.5-56.2 \times 2.5-56.2$	$2.5-110 \times 2.5-110$

$20 \times 12.5 - 20$ мкм, у *B. galli* — в пределах $6.2 - 26.2 \times 6.2 - 26.2$ мкм. Многоядерные особи содержат чаще всего до 32 ядер, реже число ядер достигает 64 у *Blastocystis* sp. и более 100 у *B. galli*. Число ядер в многоядерных стадиях обычно кратно 2, но встречаются стадии с нечетным числом ядер, что указывает на наличие как синхронных делений ядер, так и асинхронных.

Многоядерные стадии отличаются друг от друга не только по числу ядер, но и по их размерам. В одних многоядерных стадиях содержатся мелкие (около 1.25 мкм), компактные, интенсивно красящиеся в рубиновый цвет ядра, в других стадиях ядра рыхлые, крупные (около 2.5 мкм), красящиеся в розовый цвет. В многоядерных стадиях с мелкими ядрами число ядер обычно больше, чем в многоядерных стадиях с крупными ядрами. Решить вопрос о биологической сущности различий в размерах ядер пока можно лишь предположительно. Возможно это стадии, находящиеся на различных метаболических уровнях, а возможно, стадии, различающиеся по половой потенции.

Таковы общие черты строения стадий *Blastocystis* sp. и *B. galli*, развивающихся в культуре.

Наряду со сходными чертами строения бластоцисты из уток и бластоцисты из кур имеют различия. Размеры первых варьируют в меньших пределах ($2.5 - 56.2 \times 2.5 - 56.2$ мкм), чем размеры вторых ($2.5 - 110 \times 2.5 - 110$ мкм). Кроме того, характерной особенностью стадий бластоцист из уток, является наличие в цитоплазме большого числа крупных, окруженных ореолом интенсивно красящейся цитоплазмы вакуолей (рис. 3). У *B. galli* только небольшая часть особей имеет в цитоплазме вакуоли меньших размеров без интенсивно окрашенного ободка цитоплазмы (рис. 1).

Размножение бластоцист в культуре из обоих видов птиц представляется в общих чертах следующим образом. Многоядерные стадии при созревании дают начало одноядерным голым амебкам и амебкам, заключенным в сферу. Голые амебки имеют большую подвижность по сравнению с другими стадиями и, возможно, являются стадиями расселения в организме хозяина. В дальнейшем голые амебки формируют сферу и приступают к бинарным делениям, протекающим, как правило, синхронно и формируют 2-, 4-, 8- и т. д. многоядерные особи. Многоядерные стадии при созревании распадаются на число одноядерных особей, соответствующее числу ядер. За относительно короткий период 24—72 ч после посева в среду число бластоцист достигает сотен тысяч и даже десятков миллионов. Это однозначно указывает на то, что описанный процесс размножения повторяется многократно.

На вопрос, есть ли в жизненном цикле бластоцист половой процесс, на основании имеющегося материала однозначно ответить невозможно. Лишь наличие особей, имеющих различные по размерам ядра, позволяет заподозрить гамогонию.

Список литературы

- Белова Л. М., Костенко Л. А. *Blastocystis galli* sp. n. (Protista, Rhizopoda) из кишечника домашних кур // Паразитология. 1990. Т. 24, вып. 2. С. 164—168.
Alexeieff A. Sur la nature des formation dites «Kystes de Trichomonas intestinalis» // C.R. Soc. Biol. 1911. Т. 71. Р. 296—298.
Brumpt E. *Blastocystis hominis* n. sp. et formes voisines // Bull. Soc. Path. Exot. 1912. Т. 5. Р. 725—730.
Chatton E. Les «*Blastocystis*», stades du cycle évolutif de flagellés intestinaux // Compt. Rend. Soc. Biol. 1917. Т. 80. Р. 555.
Zierdt C. H. *Blastocystis hominis*, a longmisunderstood intestinal parasite // Parasitol. today. 1988. Vol. 4, N 1. P. 15—17.

ЗИН РАН, Санкт-Петербург

Поступила 22.06.1990

CULTIVATION OF BLASTOCYSTIS (RHIZOPODA, LOBOSEA) FROM HENS AND DUCKS

L.M. Belova

Key words: cultivation, Rhizopoda, *Blastocystis galli*, *Blastocystis* sp.

SUMMARY

The method of cultivation of *Blastocystis galli* from hens and *Blastocystis* sp. from ducks was worked out. *Blastocystis* grow on nutrient medium at pH 7.0 to 7.2 in a wide range of temperatures from 30 to 45C. Optimum

temperatures for cultivation are 41 to 42°C. The growth of cultures was obtained on biphasic egg medium. Solid phase of the medium presents coagulated contents of the hen's egg. Liquid phase can be made of Henk's solution with the addition of 30% of fresh or lyophilized hen serum or horse serum. Henk's solution can be replaced by medium 199 (we observed the growth of culture on medium 199 without addition of blood serum). In all variants of medium we added antibiotics on a per — 1 ml of medium basis: ampicillin — 4 thousand units, streptomycin — 1 thousand units. After 2 to 3 passages antibiotics can be excluded from the medium. Optimum medium is that with the addition of 30% of fresh hen serum. Passages go well at the transfer of 15—20% culture after 72 to 96 hours. The size of cultural stages varied within the limits of 2.5×2.5 — $56.2 \mu\text{m}$ and 2.5×110 — $110 \mu\text{m}$ for *Blastocystis* sp. and *B. galli*, respectively, the number of nuclei in one individual varied from 1 to 64, seldom over 100.

Вклейка к ст. Л.М. Беловой

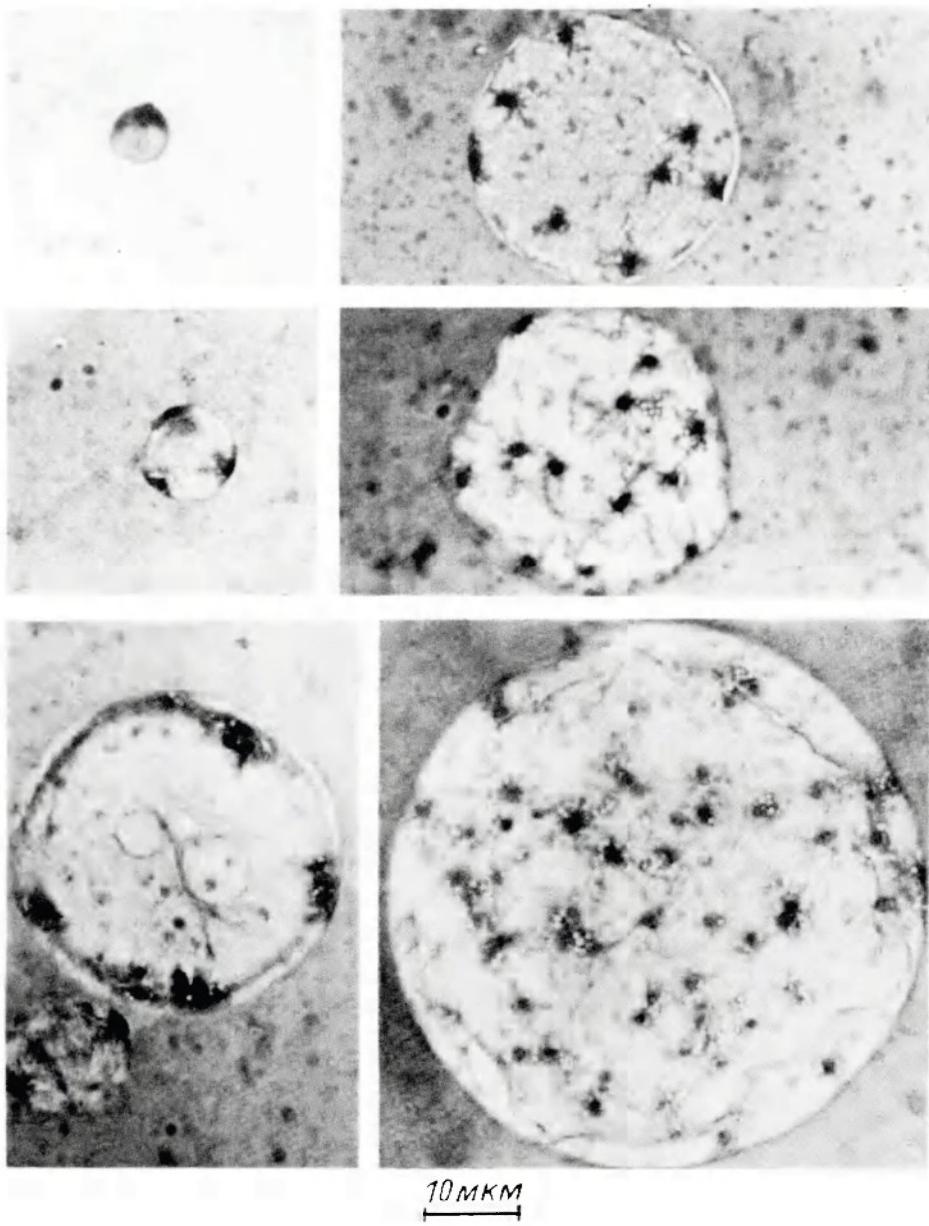


Рис. 1. Стадии *Blastocystis galli* из кур в культуре (окраска по Романовскому—Гимза).

Fig. 1. Stages *Blastocystis galli* from hens in the culture (stain by Romanovsky—Gimza).

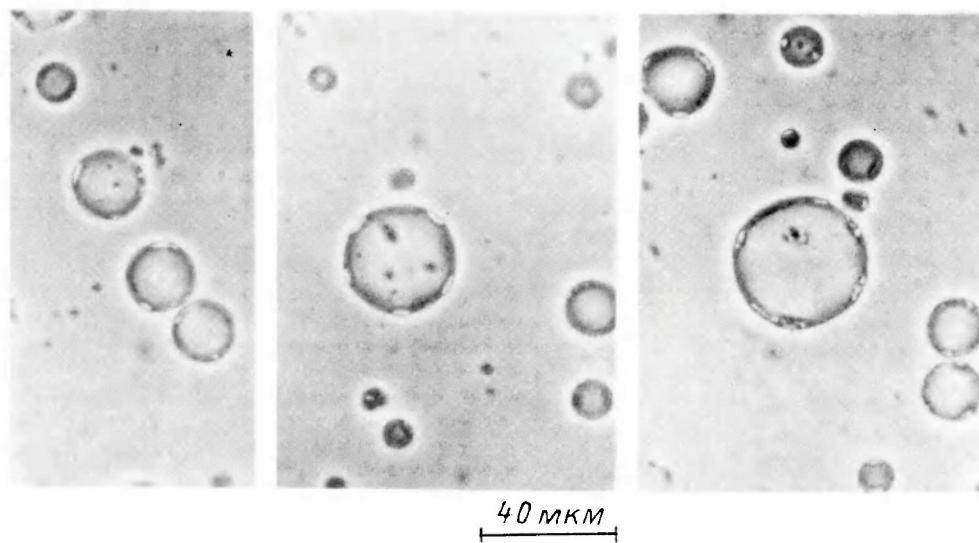


Рис. 2. Стадии *Blastocystis galli* из кур в культуре (живые клетки, фазовый контраст).

Fig. 2. Stages of *Blastocystis galli* from hens in the culture (living cells, phase contrast).

Вклейка к ст. Л.М.Беловой

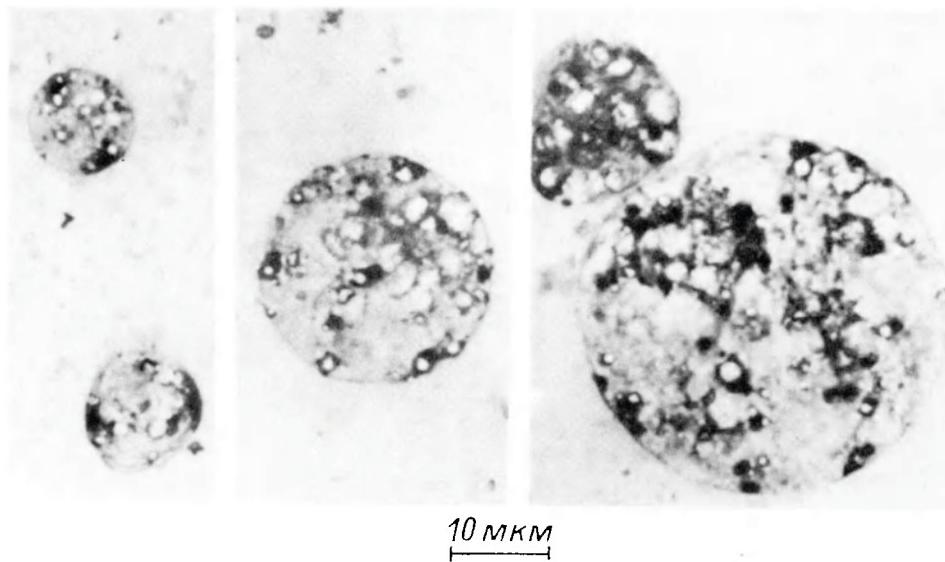


Рис. 3. Стадии *Blastocystis* sp. из уток в культуре (окраска по Романовскому—Гимза).

Fig. 3. Stages *Blastocystis* sp. from ducks in the culture (stain by Romanovsky—Gimza).